

WO2004098631

Publication Title:

ALZHEIMER'S DISEASE TREATMENT METHOD

Abstract:

Abstract of WO2004098631

The invention relates to antibodies which are used in the preparation of a medicament for the treatment of Alzheimer's disease. More specifically, the invention relates to the use of an antibody specifically recognising any one of the predominant variants of the amyloid beta peptide, Ab40 and Ab42, in the preparation of a medicament that is used to prevent and/or treat Alzheimer's disease. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
18 de Noviembre de 2004 (18.11.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/098631 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A61K 38/17, 39/00, A61P 25/28
- (21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES2004/000194
- (22) Fecha de presentación internacional: 3 de Mayo de 2004 (03.05.2004)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad: P200301054 8 de Mayo de 2003 (08.05.2003) ES
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA [ES/ES]; C/Baltasar Gracián 1, Entlo., E-50005 Zaragoza (ES).
- (72) Inventor; e
- (75) Inventor/Solicitante (para US solamente): SARASA BARRIO, Manuel [ES/ES]; C/ Baltasar Gracián 1, Entlo., E-50005 Zaragoza (ES).
- (74) Mandatario: ARAUZO PÉREZ, Jesús; Director de Otri-Universidad de Zaragoza, C/ Baltasar Gracián 1, Entlo., E-50005 Zaragoza (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

WO 2004/098631 A1

(54) Title: ALZHEIMER'S DISEASE TREATMENT METHOD

(54) Título: MÉTODO DE TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

(57) Abstract: The invention relates to antibodies which are used in the preparation of a medicament for the treatment of Alzheimer's disease. More specifically, the invention relates to the use of an antibody specifically recognising any one of the predominant variants of the amyloid beta peptide, Ab40 and Ab42, in the preparation of a medicament that is used to prevent and/or treat Alzheimer's disease.

(57) Resumen: Anticuerpos en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. El uso de un anticuerpo, que reconoce de forma específica cualquiera de las variantes predominantes del péptido beta amiloide, Ab40 y Ab42 en la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

MÉTODO DE TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La presente invención se relaciona con un método de
5 tratamiento y/o prevención de enfermedades asociadas
con la presencia de depósitos amiloides, entre las que
se encuentra la enfermedad de Alzheimer.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10 Se conocen ciertos hechos acerca de los fenómenos
bioquímicos y metabólicos asociados con la presencia de
la enfermedad de Alzheimer (AD). Dos cambios
morfológicos e histopatológicos observados en cerebros
15 con enfermedad de Alzheimer son las marañas
neurofibrilares (NFT) y los depósitos amiloides. Las
marañas neurofibrilares intraneuronales están presentes
también en otras enfermedades neurodegenerativas, pero
la presencia de los depósitos amiloides tanto en los
20 espacios intraneuronales (placas neuríticas) como en
las proximidades de la microvasculatura (placas
vasculares) parece ser característico de la enfermedad
de Alzheimer. De estas, las placas neuríticas parecen
ser las más frecuentes (Price, D.L., y col., Drug
25 Development Research (1985) 5:59-68).

El componente principal de estas placas amiloides es un
péptido de 40-42 aminoácidos denominado péptido
amiloide A β 4.

30 El péptido amiloide A β 4 es un polipéptido originado por
proteólisis a partir de unas glucoproteínas de membrana
denominadas proteínas precursoras del péptido amiloide
A β 4 (β APP). Estando estas proteínas, precursoras del
35 péptido amiloide, constituidas por 695 a 770

aminoácidos, siendo todas ellas producidas por el mismo gen.

Se han identificado dos variantes principales del péptido amiloide A β 4, el péptido A β 40 y el A β 42, de 40 y 42 aminoácidos respectivamente, que presentan una distribución tisular diferente en condiciones tanto fisiológicas como patológicas. Es la variante de 42 aminoácidos la forma predominante en las placas amiloides localizadas en cerebros de enfermos de Alzheimer.

Hasta la fecha se han propuesto diferentes posibles soluciones hacia una posible vacuna frente a la enfermedad de Alzheimer.

En EP526511 se propone la administración de dosis homeopáticas de A β a pacientes con AD preestablecida. Sin embargo, debido a que las dosis empleadas apenas varían los niveles de A β endógeno circulante en plasma, no se espera ningún beneficio terapéutico.

Schenk et al., (Nature, 1999 ; 400 : 173-177) describe la inmunización con A β 42, de ratones transgénicos PDAPP, los cuales sobreexpresan APP mutante humana, preveniendo la formación de placas amiloides, distrofia neurítica y astrogliosis.

En WO9927944 (Schenk D.) se describe el tratamiento de AD por administración de A β 42 a un paciente.

Un ensayo clínico de fase II en 360 pacientes diagnosticados con media a moderada AD en 4 países Europeos y Estados Unidos en el que se empleaba péptido amiloide A β 42 como antígeno, fue discontinuado tras

reportarse encefalitis en algunos de los pacientes (Scrip Daily Online, 25 Feb 2002, S007455320, The Scientist 16[7]:22, Apr. 1, 2002).

- 5 El problema de emplear como vacuna una proteína endógena (o una proteína presente naturalmente en el animal que está siendo vacunado), como es en el caso de el péptido A β 42, el organismo responde fabricando anticuerpos frente a A β 42 y frente a fracciones más cortas que pueden tener también funciones fisiológicas todavía desconocidas, entre algunos de los posibles problemas podemos citar el posible desarrollo de enfermedades autoinmunes debido a la generación de anticuerpos frente a la proteína endógena, dificultad en la generación de una respuesta inmune debido al fallo del sistema inmune para reconocer antígenos endógenos, posible desarrollo de una respuesta inflamatoria aguda.
- 10
- 15
- 20 La presente invención está dirigida al tratamiento de Alzheimer y otras enfermedades amiloideas por administración de un péptido, de la parte C-terminal de A β , conjugado con una proteína, que en una realización preferida de la presente invención dicha proteína es la hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin en inglés).
- 25

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

- 30 La presente invención se relaciona con una vacuna para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y de otras enfermedades amiloideas relacionadas.
- 35 Según una realización preferida de la presente

invención, se proporciona una vacuna para la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y de otras enfermedades relacionadas, que supera las desventajas asociadas a usar péptidos, proteínas o 5. immunógenos endógenos.

Ejemplos de otras enfermedades caracterizadas por depósitos amiloideos son Síndrome Hereditario Islánico, mieloma múltiple, encefalopatías espongiforme, 10 incluyendo la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

La inducción de una respuesta inmune puede ser activa como cuando un immunógeno es administrado para inducir anticuerpos que reaccionan con A_β en un paciente, o 15 pasiva, como cuando es administrado un anticuerpo que reacciona por sí mismo con A_β en un paciente.

Para los propósitos de la presente invención, los siguientes términos son definidos a continuación:

20 El término "enfermedades amiloideas relacionadas" incluye enfermedades asociadas con la acumulación de amiloide el cual puede estar restringido a un organo, amiloidosis localizada, o difundido en varios órganos, 25 amiloidosis sistémica. Amiloidosis secundaria puede ser asociada con infecciones crónicas (como p.e. tuberculosis) o inflamación crónica (p.e. artritis reumatoide), Fiebre Mediterránea Familiar (FMF) y otro tipo de amiloidosis sistémica encontrada en pacientes 30 en tratamiento de hemodiálisis de largo plazo. Formas localizadas de amiloidosis incluye, sin limitarse a estas, diabetes tipo II y cualquier otra enfermedad relacionada con esta, enfermedades neurodegenerativas con SCRAPIE, encefalitis espongiforme bovina,

enfermedad de Cretzfeldt-Jakob, enfermedad de Alzheimer, angiopatía amiloide cerebral.

El término "inmunización pasiva" es utilizado para
5 referirse a la administración de anticuerpos o fragmentos de ellos a un individuo con la intención de conferirle inmunidad.

En un primer aspecto, la invención proporciona el uso
10 bien de un péptido que actúa como inmunógeno o bien de un anticuerpo, en la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por la acumulación de depósitos amiloides. Dichos métodos consisten en la inducción de
15 una respuesta inmune contra un componente peptídico de los depósitos amiloides en el paciente. Dicha inducción puede ser activa por administración de un inmunógeno o pasiva por administración de un anticuerpo o un fragmento activo o derivado de un anticuerpo.

20 En una realización preferida de la presente invención, la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.

El medicamento obtenido puede ser empleado tanto en
25 pacientes asintomáticos como en aquellos que ya muestran síntomas de la enfermedad.

De acuerdo con la presente invención, las composiciones capaces de provocar una respuesta inmune dirigida
30 contra ciertos componentes de las placas amiloideas son efectivas para el tratamiento o prevención de enfermedades relacionadas con depósitos amiloides. En particular, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, es posible prevenir el progreso, disminuir
35 los síntomas y/o reducir el proceso de deposición

amiloide en un individuo, cuando una dosis inmunoestimulatoria de un péptido o de un anticuerpo obtenido a partir de éste, es administrado a el paciente.

5

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, los anticuerpos son obtenidos por inmunización de mamíferos o aves, mediante el empleo de un péptido conjugado a una proteína como inmunógeno.

10

Según una forma de realización preferida de la presente invención, los mamíferos empleados para su inmunización pueden ser rumiantes, équidos, lagomorfos, carnívoros, primates o cualquier otro animal que permita obtener cantidades de suero adecuadas como para extraer de éste suficiente cantidad de anticuerpo. De entre las aves empleadas para su inmunización podemos citar, no considerándose de forma limitativa, las galliformes, anseriformes y columbiformes, entre otras.

15

Según una forma de realización preferida de la presente invención, ésta proporciona el uso de un péptido conjugado a una proteína que actúa como inmunógeno para la producción de anticuerpos capaces de reconocer de

20

forma específica cualquiera de las variantes predominantes del péptido beta amiloide A β 40 y A β 42 en la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad caracterizada por la acumulación de depósitos amiloides en el cerebro de un paciente.

Según una forma de realización más preferida de la presente invención, la proteína utilizada para su conjugación con el péptido es la hemocianina de lapa

25

(KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin en inglés).

De acuerdo con una realización aún más preferida de la presente invención, el péptido es seleccionado entre un grupo que consiste en el péptido de SEQ ID NO 1, el

- 5 péptido de SEQ ID NO 2, el péptido de SEQ ID NO 3, el péptido de SEQ ID NO 4, los péptidos resultantes de acortar por eliminación de los restos de aminoácido de los extremos N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 1, de SEQ ID NO 2, de SEQ ID NO 3 o de SEQ ID NO 4 y los
10 péptidos resultantes de alargar por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína a cualquiera de los péptidos de SEQ ID NO 1, de SEQ ID NO 2, de SEQ ID NO 3 o de SEQ ID NO 4.

- 15 De acuerdo con otra realización preferida, el péptido es seleccionado entre el grupo constituido por el péptido de SEQ ID NO 1, los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 1 y los péptidos
20 resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

- 25 En otra realización preferida de la presente invención, el péptido es seleccionado entre el grupo constituido por el péptido de SEQ ID NO 2, los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 2 y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las
30 secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

- 35 En otra realización preferida, el péptido es seleccionado entre el grupo constituido por el péptido de SEQ ID NO 3, los péptidos con una secuencia

resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 3 y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para 5 la conjugación de la proteína.

En otra realización preferida, el péptido es seleccionado entre el grupo constituido por el péptido de SEQ ID NO 4, los péptidos con una secuencia 10 resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 4 y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

15 De acuerdo con otra forma de realización de la presente invención, ésta proporciona el uso de un anticuerpo o un fragmento activo o derivado de un anticuerpo que reconoce de forma específica cualquiera de las 20 variantes predominantes del péptido beta amiloide, A β 40 y A β 42 en la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad caracterizada por la acumulación de depósitos amiloideos en el cerebro de un paciente.

25 Según una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo o un fragmento activo o derivado del anticuerpo que reconoce de forma específica cualquiera de las variantes predominantes 30 del péptido A β , es obtenido a partir de un péptido seleccionado a partir de un grupo que consiste en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, opcionalmente acortados por eliminación de los restos de aminoácido de los extremos N-terminal y/o C-terminal, y opcionalmente alargados por adición de los 35

restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína.

- En otra forma de realización más preferida, dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o aves con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por el péptido de SEQ ID NO 1, los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 1 y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.
- En otra forma de realización preferida, dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o aves con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por el péptido de SEQ ID NO 2, los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 2 y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.
- En otra forma de realización preferida, dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o aves con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por el péptido de SEQ ID NO 3, los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 3 y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

En otra forma de realización preferida, dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o 5 aves con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por el péptido de SEQ ID NO 4, los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 4 y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las 10 secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

En esta solicitud los aminoácidos se abrevian utilizando los códigos de una letra aceptados en 15 el campo, en la forma que se muestra a continuación:

A= Ala= alanina,
C= Cys= cisteína,
D= Asp= ácido aspártico,
20 E= Glu= ácido glutámico,
F= Phe= fenilalanina,
G= Gly= glicina,
H= His= histidina,
I= Ile= isoleucina,
25 K= Lys= lisina,
L= Leu= leucina,
M= Met= metionina,
N= Asn= asparagina,
P= Pro= prolina
30 Q= Gln= glutamina,
R= Arg= arginina,
S= Ser= serina,
T= Thr= treonina,
V= Val= valina,
35 W= Trp= triptofano,

Y= Tyr= tirosina,

Las secuencias descritas anteriormente en la presente invención, e identificadas como SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 5 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4 se corresponden con las siguientes secuencias de aminoácidos:

SEQ ID NO 1	LVFFAEDV
SEQ ID NO 2	GLMVGGVV
10 SEQ ID NO 3	GLMVGGVVIA
SEQ ID NO 4	RHDSGYEVHHQK

Los anticuerpos obtenidos a partir de los péptidos anteriores reciben en la presente solicitud los códigos 15 de SAR-1, SAR-2, SAR-3 y SAR-4 correspondiéndose con éstos como se indica a continuación:

SEQ ID NO 1	SAR-2
SEQ ID NO 2	SAR-3
20 SEQ ID NO 3	SAR-4
SEQ ID NO 4	SAR-1

La información relativa a la identificación de las secuencias peptídicas, descritas en la presente 25 invención, que se acompaña a la presente memoria en formato legible por ordenador, es idéntica al listado de secuencias que se presenta acompañando a la memoria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30 Figura 1.- Placas amiloides en cerebros con Alzheimer detectadas con los anticuerpos SAR-1, SAR-2, SAR-3 y SAR-4.

Figura 2.- Western Blot en el que se demuestra la especificidad de los anticuerpos. SAR-3 detecta específicamente la proteína amiloide de 40 aminoácidos ($\text{A}\beta 40$), SAR-4 la de 42 aminoácidos ($\text{A}\beta 42$) y SAR-1 las 5 dos isoformas, pero teniendo más afinidad por la supuestamente más neurotóxica $\text{A}\beta 42$. En cada calle se ha cargado el péptido indicado ($\text{A}\beta 40$ ó $\text{A}\beta 42$) en la cantidad de nanogramos especificada (10, 100, 200 ó 10 500). En los westerns se aprecia también que los 10 anticuerpos SAR-3 y SAR-4 detectan tanto los monómeros (mucho más abundantes) como los dímeros del péptido correspondiente.

EJEMPLOS

15

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1. Generación de los anticuerpos policlonales.

20

Los cuatro anticuerpos policlonales fueron generados por inmunización de conejos New Zealand White contra los cuatro péptidos acoplados a KLH que se utilizaron como inmunógeno.

25

Cada inmunógeno se inyectó en dos conejos, realizándose cinco inyecciones: la primera inyección intradérmica del conjugado péptido-KLH en PBS y emulsionados en adyuvante completo de Freund y cuatro más 30 intramusculares, a modo de dosis de recuerdo en los días 14, 28, 49 y 80, del mismo conjugado péptido-KLH en PBS pero esta vez emulsionados en adyuvante incompleto de Freund, realizándose la sangría de control a los 90 días para detectar la presencia de los 35 anticuerpos.

Tras la recogida de sangre, se separó el suero y se prepurificó mediante desalado y posteriormente se purificaron los anticuerpos por afinidad en una matriz compuesta por 1,5 ml de material EMD-Epoxy activated (Merck) a la que se añadió 5mg del correspondiente péptido. Las fracciones purificadas se estabilizaron en 0.1% de BSA (Sigma) y se conservaron a 4 °C, pudiéndose añadir glicerol 20-50% como crioprotector.

10

Ejemplo 2. WESTERN-BLOT para A β

1. ELECTROFORESIS

- 15 Se utilizó el método de Laemmli, descrito en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1998, modificado para mejorar la separación de péptidos pequeños.
- 20 El aparato empleado fué un Miniprotean 3 de Bio-Rad.

Se utilizó un gel del 15% de acrilamida, mezclando los siguientes componentes:

25

SOLUCIONES STOCK	SEPARATING GEL (15 %)	STACKING GEL
40 % Acrilamida	3,75 ml	500 μ l
Tris 3 M pH=8,45	3,3 ml	250 μ l
Glicerol	1,05 ml	-
Agua	1,9 ml	4,2 ml
SDS 20 %	50 μ l	18,6 μ l
APS 10%	50 μ l	25 μ l
TEMED	10 μ l	5 μ l

Se partió de disoluciones stock de péptido A β 40 y 42 de

- 35 1 mg/ml. (disueltos en PBS). Se tomó el volumen

necesario de estas soluciones para cada una de las muestras y lo llevamos hasta 20 μ l con SBLT (SBL + Tris base 2 M). A continuación se hirvieron las muestras durante 5 minutos para desnaturalizar los péptidos y 5 eliminar posibles proteasas.

Se llenó el centro de la cubeta con tampón catódico y el exterior con tampón anódico, siendo la composición de estos tampones las siguientes:

10

Tampón Anódico
24.2 g Tris base (0.2 M final)
Diluir a 1 litro con H₂O
Ajustar a pH 8.9 con HCl concentrado
15 Almacenar a 4°C hasta 1 mes

Tampón Catódico
12.11 g Tris base (0.1 M final)
17.92 g tricine (0.1 M final)

20 1 g SDS (0.1% final)

Diluir a 1 litro con H₂O
No ajustar el pH.
Almacenar a 4°C hasta 1 mes

25 Finalmente se cargaron las muestras en los pocillos: 20 μ l/pocillo. Utilizando como marcador el Polypeptide Standard Kaleidoscope de Bio-Rad, se comenzó la migración a bajo voltaje (30 V), y posteriormente se subió hasta los 100 V, transcurrida aprox. 1 hora de 30 electroforesis

2.- TRANSFERENCIA A MEMBRANA

15

Se transfirieron las proteínas separadas en el gel a una membrana de PVDF, mediante el electroblotting. En los "librillos" de transferencia se colocaron:

- 5 Lado negro---esponja---3 papeles Whatmann (o de filtro)--- gel--- membrana--- 3 papeles Whatmann--- esponja--- lado transparente

- 10 A continuación se llenó la cubeta con "electroblotting buffer":

Glicina 38 mM

Tris base 50 mM

Metanol 40%

15

Se realizó la transferencia durante 2 horas a 200 mA. Durante la transferencia se mantuvo la agitación del buffer con agitador magnético.

20 3.- INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS

Los anticuerpos y la leche en polvo se disolvieron en PBS-T (PBS + 0,5 % Tween 20), realizándose los lavados también con PBS-T.

- 25 Tras la transferencia se bloqueó la superficie de la membrana con solución 5 % de leche en polvo, durante 1 hora con agitación y a temperatura ambiente (RT)

Tras lo cual se lavó la membrana 2 x 5 min. a RT.

30

A continuación se incubó con anticuerpo primario (SAR-1, SAR-2, SAR-3 o SAR-4) 1 hora a RT como mínimo diluido 1:500 en PBS-T.

- 35 Se realizó el lavado de la membrana: 3 x 10 min. a RT

Posteriormente se incubó con anticuerpo secundario:
anti-conejo de cabra conjugado a peroxidasa de rábano
(goat anti-rabbit-HRP) durante 1 hora a RT (1:10.000 en
5 todos los casos).

Se realizó de nuevo el lavado de la membrana: 3 x 10
min. a RT

10 4.- REVELADO

Tras el último lavado se incubó la membrana con la
solución del kit de quimioluminiscencia. Utilizándose
el kit ECL+Plus de Pharmacia.

15

Se envolvió la membrana en papel celofán y la expusimos
a film (Hyperfilm MP de Amersham) de doble emulsión,
durante distintos tiempos, entre 30 seg. y 2 minutos.

20 Ejemplo 3. Inmunohistoquímica con anticuerpos SAR-1,
SAR-2, SAR-3 y SAR-4 en tejido de cerebro humano.

Las secciones de tejido se fijaron en parafina
siguiendo los siguientes pasos:

25

- a) fijación en formol neutro al 10%
- b) deshidratación por pases sucesivos en
concentraciones crecientes de alcohol
- c) pases por xilol y parafina, esta última en estufa
de 60-62 °C
- d) realización de los bloques de parafina, los
cuales se cortan a 4 micras y se montan en
portaobjetos

A continuación, dichas secciones fueron desparafinadas

35 mediante pases por las siguientes soluciones:

	Xilol	100%	10 minutos
	Xilol	100%	10 minutos
	Etanol	100%	5 minutos
5	Etanol	100%	5 minutos
	Etanol	96%	5 minutos
	Etanol	90%	5 minutos
	Etanol	70%	5 minutos
	PBS		5 minutos X 3 veces

10

Posteriormente se trataron de la siguiente forma:

a)Ácido fórmico al 96% durante 3 minutos en campana de gases y en agitación.

b)Lavado rápido de agua

15 c)Lavados en PBS 2 X 5 minutos

d)Bloqueo de las peroxidases endógenas durante 15 minutos en una solución formada por 70ml de PBS, 30ml de metanol y 1ml de H₂O₂

e)Lavados en PBS 3 X 5 minutos

20 f)Lavados en PBS/T (Triton o Tween-20 al 0,5% en PBS) 3 X 5 minutos

g)Bloqueo de las uniones inespecíficas con suero de cabra (Normal Goat Serum) diluído 10:100 en PBS/T durante dos horas

25 h)Incubación de los anticuerpos primarios toda la noche a 4° C en cámara húmeda:

SAR-1....Dilución 1:150 en PBS

SAR-2....Dilución 1:1500 en PBS

SAR-3....Dilución 1:1500 en PBS

30 SAR-4....Dilución 1:2000 en PBS

i)Lavados de PBS/T 3 X 5 minutos

j)Incubación en anticuerpo secundario (anti-conejo de cabra) diluído 1:200 en PBS durante 45 minutos

k)Lavados de PBS 4 X 5 minutos

- l) Incubación del ABC (complejo avidina-biotina) de Vector Labs a una dilución de 1:100 en PBS/T durante 45 minutos en oscuridad, manteniéndose esta condición hasta finalizar el revelado
- 5 m) Lavados de PBS 3 X 5 minutos
- n) Revelado en diaminobencidina (DAB).

Se controló el tiempo empíricamente bajo microscopio estereoscópico. Para ello, primero se hizo un lavado en 10 una solución de Tris-HCl 0.5 M durante 10 minutos en agitación, para proseguir con la incubación con un sustrato diaminobencidina (DAB) diluida en Tris-HCl 0.05M y a la que se añade 0.5 μ l/ml de H₂O₂ a 4°C. Una vez finalizada la reacción se realizaron tres lavados 15 en PBS a 4°C de 5 minutos cada uno y se procedió a la deshidratación en etanol al 70%, 90% y 100% durante 2 minutos cada uno, pase por xilol de 4 minutos y otro pase de xilol de 2 minutos, hasta que se montaron con Eukitt para su observación al microscopio.

20

Listado de Secuencias.

NUMERO DE SECUENCIAS: 4

25

INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 1:

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 8

TIPO: aminoácido

30 TIPO DE MOLECULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 1

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val

35 1

5

INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 2:

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 8

5 TIPO: aminoácido

TIPO DE MOLECULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 2

10 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val

1 5

INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 3:

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

15 LONGITUD: 10

TIPO: aminoácido

TIPO DE MOLECULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

20 SEQ ID NO 3

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

1 5 10

INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 4:

25 CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 12

TIPO: aminoácido

TIPO DE MOLECULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

30 DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 4

Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1 5 10

REIVINDICACIONES

1. El uso de un péptido conjugado a una proteína que actúa como inmunógeno para la producción de anticuerpos capaces de reconocer de forma específica cualquiera de las variantes predominantes del péptido beta amiloide A β 40 y A β 42 en la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad caracterizada por la acumulación de depósitos amiloideos en el cerebro de un paciente.
5
2. El uso según la reivindicación anterior caracterizado porque la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.
- 10 3. El uso según la reivindicación anterior 1, caracterizado porque la proteína es la hemocianina de lapa (KLH).
- 15 4. El uso según cualquiera de la reivindicaciones anteriores 1 a 3, caracterizado porque el péptido es seleccionado a partir de un grupo que consiste en:
 - el péptido de SEQ ID NO 1, el péptido de SEQ ID NO 2, el péptido de SEQ ID NO 3, el péptido de SEQ ID NO 4;
- 20 25 - los péptidos resultantes de acortar por eliminación de los restos de aminoácido de los extremos N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 1, de SEQ ID NO 2, de SEQ ID NO 3 o de SEQ ID NO 4;
- 30 - y los péptidos resultantes de alargar por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína a cualquiera de los péptidos de SEQ ID NO 1, de SEQ ID NO 2, de SEQ ID NO 3 o de SEQ ID NO 4.

5. El uso según la reivindicación anterior 4, caracterizado porque el péptido es seleccionado entre el grupo constituido por:

- el péptido de SEQ ID NO 1;
- los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 1;
- y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

10. El uso según la reivindicación anterior 4, caracterizado porque el péptido es seleccionado entre el grupo constituido por:

- el péptido de SEQ ID NO 2;
- los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 2;
- y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

15. El uso según la reivindicación anterior 4, caracterizado porque el péptido es seleccionado entre el grupo constituido por:

- el péptido de SEQ ID NO 3;
- los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 3;
- y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

8. El uso según la reivindicación anterior 4, caracterizado porque el péptido es seleccionado entre el grupo constituido por:
 - el péptido de SEQ ID NO 4;
 - 5 - los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 4;
 - y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.
9. El uso de un anticuerpo o un fragmento activo o derivado de un anticuerpo que reconoce de forma específica cualquiera de las variantes predominantes del péptido beta amiloide, A β 40 y A β 42 en la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad caracterizada por la acumulación de depósitos amiloides en el cerebro de un paciente.
10. El uso según la reivindicación anterior 9, caracterizado porque la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.
11. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 9 a 10, caracterizado porque el anticuerpo o un fragmento activo o derivado del anticuerpo que reconoce de forma específica cualquiera de las variantes predominantes del péptido A β , es obtenido a partir de un péptido seleccionado a partir de un grupo que consiste en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, opcionalmente acortados por eliminación de los restos de aminoácido de los extremos N-terminal y/o C-terminal, y opcionalmente alargados por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína.

12. El uso según la reivindicación 9, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o aves con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por:

- el péptido de SEQ ID NO 1;
- los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 1;
- 10 - y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

13. El uso según la reivindicación 9, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o aves con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por:

- el péptido de SEQ ID NO 2;
- los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 2;
- y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

14. El uso según la reivindicación 9, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o aves con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por:

- el péptido de SEQ ID NO 3;
- los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 3;

- y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

5. 15. El uso según la reivindicación 9, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o aves con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por:

- 10 - el péptido de SEQ ID NO 4;
- los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 4;
- y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.
- 15

21042003.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Universidad de Zaragoza
<120> Anticuerpos en la preparación de un medicamento para el tratamiento
de la enfermedad de Alzheimer.

<130>

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Síntesis Química

<400> 1

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
1 5

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Síntesis Química

<400> 2

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
1 5

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Síntesis Química

<400> 3

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
1 5 10

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Síntesis Química

21042003.ST25

<400> 4

Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2004/000194

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ A61K 38/17, A61K 39/00, A61P 25/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, REG, HCAPLUS, MEDLINE, BIOSIS.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9927944 A (ATHENA NEUROSCIENCES, INC., USA), 10.06.1999, the whole document especially page 4, lines 34-39; page 5, lines 1-5, 15-20; page 49, line 5.	1-4, 7, 9-11, 14 5, 6, 8, 12, 13, 15
X	WO 0072880 A (NEURALAB LIMITED), 07.12.2000, the whole document especially page 61, line 3; pages 67-69.	4, 7, 11, 14
Y	WO 9615452 A (ATHENE NEUROSCIENCES, INC., USA), 23.05.1996, the whole document especially page 27, line 22; page 20, line 11.	4, 7, 11, 14
Y	WO 9012870 A (RESEARCH FOUNDATION FOR MENTAL HYGIENE, INC., USA), 01.11.1990, the whole document especially page 6, line 13.	4, 5, 11, 12
PX	WO 2004013172 A (INNOGENETICS, N.V.), 12.02.2004, SEQ ID n° 74	4, 8, 11, 15

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier document but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 July 2004 (26.07.2004)

Date of mailing of the international search report

03 August 2004 (03.08.2004)

Name and mailing address of the ISA/

SPTO

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2004/000194

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PY	EP 1371986 A (A-BETA G.m.b.H), 17.12.2003, SEQ ID n° 2.	4,6,11,13
PY	ES 2201929 A (UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA, OTRI), 16.03.2004, the whole document.	4-8,11-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/ES 2004/000194

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9927944 A	10.06.1999	CA 2312920 A AU 1706199 A ZA 9810932 A NO 20002784 A EP 1033996 A EP 19980961833 ID 25504 A BR 9815357 A HR 20000443 A CN 1281366 T BG 104562 A EE 200000379 A DE 1033996 T PL 342649 A HU 0100627 A TR 200001608 T JP 2002502802 T US 6710226 B US 2004081657 A US 6743427 B US 6750324 B	10.06.1999 16.06.1999 02.07.1999 31.07.2000 13.09.2000 30.11.1998 05.10.2000 24.10.2000 31.10.2000 24.01.2001 31.01.2001 16.04.2001 07.06.2001 18.06.2001 28.06.2001 23.07.2001 29.01.2002 23.03.2004 29.04.2004 01.06.2004 15.06.2004
WO 0072880 A	07.12.2000	CA 2370311 A AU 5303100 A NO 20015773 A BR 0011000 A EP 1185298 A EP 20000937919 TR 200103447 T GB 2368794 A DE 10084643 T CN 1359301 T HU 0201250 A BG 106241 A SK 16982001 A CZ 20013824 A TR 200202231 T ZA 200109487 A EE 200100626 A JP 2003517461 T US 6710226 B NZ 515403 A US 6743427 B US 6750324 B	07.12.2000 18.12.2000 25.01.2002 19.02.2002 13.03.2002 26.05.2000 22.04.2002 15.05.2002 11.07.2002 17.07.2002 28.08.2002 30.08.2002 06.11.2002 13.11.2002 21.11.2002 17.02.2003 17.02.2003 27.05.2003 23.03.2004 28.05.2004 01.06.2004 15.06.2004
WO 9615452 A	23.05.1996	CA 2205359 A AU 4154496 A EP 0792458 A EP 19950939892 JP 10509797 T	23.05.1996 06.06.1996 03.09.1997 13.11.1995 22.09.1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No PCT/ES 2004/000194

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		AU 705907 B US 6114133 A JP 2004077499 A	03.06.1999 05.09.2000 11.03.2004
WO 9012870 A	01.11.1990	AU 5525090 A	16.11.1990 16.11.1990 16.11.1990
WO2004013172 A	12.02.2004	NONE	-----
EP 1371986 A	17.12.2003	EP 20020012583 WO 03104812 A	06.06.2002 18.12.2003
ES 2201929 A	16.03.2004	WO 2004024770 A	25.03.2004 25.03.2004 25.03.2004

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2004/000194

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ A61K 38/17, A61K 39/00, A61P 25/28

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
CIP⁷ A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, REG, HCAPLUS, MEDLINE, BIOSIS.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	WO 9927944 A (ATHENA NEUROSCIENCES, INC., USA), 10.06.1999, todo el documento especialmente página 4, líneas 34-39; página 5, líneas 1-5, 15-20; página 49, línea 5.	1-4, 7, 9-11, 14
Y	WO 0072880 A (NEURALAB LIMITED), 07.12.2000, todo el documento, especialmente página 61, línea 3; páginas 67-69.	5,6,8,12,13,15
X	WO 9615452 A (ATHENE NEUROSCIENCES, INC., USA), 23.05.1996, todo el documento especialmente página 27, línea 22; página 20, línea 11.	4,7,11,14
Y	WO 9012870 A (RESEARCH FOUNDATION FOR MENTAL HYGIENE, INC., USA), 01.11.1990, todo el documento especialmente página 6, línea 13.	4,5,11,12
PX	WO 2004013172 A (INNOGENETICS, N.V.), 12.02.2004, SEQ ID nº 74	4,8,11,15

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de "X" prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a "Y" una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

26 Julio 2004 (26.07.2004)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

03 AGO 2004 03.08.2004

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

M. Novoa Sanjurjo

Nº de teléfono + 34 91 3495552

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2004/000194

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
PY	EP 1371986 A (A-BETA G.m.b.H), 17.12.2003, SEQ ID nº 2.	4,6,11,13
PY	ES 2201929 A (UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA, OTRI), 16.03.2004, todo el documento.	4-8,11-15

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2004/000194

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17.2.a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. Las reivindicaciones n^{os}:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. Las reivindicaciones n^{os}:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

3. Las reivindicaciones n^{os}:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:
Ver hoja adicional

1. Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza

3. Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n^{os}:

4. Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n^{os}:

Indicación en cuanto a la protesta

- Las tasas adicionales han sido acompañadas de una protesta por parte del solicitante.
 El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2004/000194

La solicitud de patente no tiene unidad de invención ya que comprende más de una sola invención o grupos de invenciones descritos a continuación:

- 1.- Uso del péptido SEQ ID nº 1 o de un anticuerpo obtenido a partir del mismo, en la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer;
- 2.- Uso del péptido SEQ ID nº 2 o de un anticuerpo obtenido a partir del mismo, en la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer;
- 3.- Uso del péptido SEQ ID nº 3 o de un anticuerpo obtenido a partir del mismo, en la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 4.- Uso del péptido SEQ ID nº 4 o de un anticuerpo obtenido a partir del mismo, en la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer;

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2004/000194

Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (Continuación del punto 1.b de la primera hoja)

1. En lo que se refiere a las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de:
 - a) Tipo de material
 - una lista de secuencias
 - Tabla(s) relativas a la lista de secuencias
 - b) Formato del material
 - por escrito
 - en soporte legible por ordenador
 - c) Fecha de presentación/entrega
 - contenido en la solicitud internacional tal y como se presentó
 - presentado junto con la solicitud internacional en formato legible por ordenador
 - presentado posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda
2. Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias y/o tabla relacionada con ella, se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.
3. Comentarios adicionales:

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2004/000194

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9927944 A	10.06.1999	CA 2312920 A AU 1706199 A ZA 9810932 A NO 20002784 A EP 1033996 A EP 19980961833 ID 25504 A BR 9815357 A HR 20000443 A CN 1281366 T BG 104562 A EE 200000379 A DE 1033996 T PL 342649 A HU 0100627 A TR 200001608 T JP 2002502802 T US 6710226 B US 2004081657 A US 6743427 B US 6750324 B	10.06.1999 16.06.1999 02.07.1999 31.07.2000 13.09.2000 30.11.1998 05.10.2000 24.10.2000 31.10.2000 24.01.2001 31.01.2001 16.04.2001 07.06.2001 18.06.2001 28.06.2001 23.07.2001 29.01.2002 23.03.2004 29.04.2004 01.06.2004 15.06.2004
WO 0072880 A	07.12.2000	CA 2370311 A AU 5303100 A NO 20015773 A BR 0011000 A EP 1185298 A EP 20000937919 TR 200103447 T GB 2368794 A DE 10084643 T CN 1359301 T HU 0201250 A BG 106241 A SK 16982001 A CZ 20013824 A TR 200202231 T ZA 200109487 A EE 200100626 A JP 2003517461 T US 6710226 B NZ 515403 A US 6743427 B US 6750324 B	07.12.2000 18.12.2000 25.01.2002 19.02.2002 13.03.2002 26.05.2000 22.04.2002 15.05.2002 11.07.2002 17.07.2002 28.08.2002 30.08.2002 06.11.2002 13.11.2002 21.11.2002 17.02.2003 17.02.2003 27.05.2003 23.03.2004 28.05.2004 01.06.2004 15.06.2004
WO 9615452 A	23.05.1996	CA 2205359 A AU 4154496 A EP 0792458 A EP 19950939892 JP 10509797 T	23.05.1996 06.06.1996 03.09.1997 13.11.1995 22.09.1998

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2004/000194

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
		AU 705907 B US 6114133 A JP 2004077499 A	03.06.1999 05.09.2000 11.03.2004
WO 9012870 A	01.11.1990	AU 5525090 A	16.11.1990 16.11.1990 16.11.1990
WO2004013172 A	12.02.2004	NINGUNO	-----
EP 1371986 A	17.12.2003	EP 20020012583 WO 03104812 A	06.06.2002 18.12.2003
ES 2201929 A	16.03.2004	WO 2004024770 A	25.03.2004 25.03.2004 25.03.2004